

2013 年度 修士論文要旨

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における

鉄応答機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 松田研究室 吉永亮

海洋性珪藻は、海洋において最も繁栄している一次生産者である。しかし、海洋には主要な栄養素が豊富に存在するにも関わらず、植物プランクトンの生育が悪い HNLC (High-Nutrient, Low-Chlorophyll) 海域が存在している。これら HNLC 海域における主要制限栄養素は鉄であるとされ、海洋光独立栄養生物の鉄欠乏応答は、HNLC 海域の形成メカニズムの理解に重要である。一般的に生物は、細胞外の様々な形態の鉄に応答し、それを獲得、蓄積する仕組みを持つが、珪藻におけるこれらの仕組みのほとんどが未解明である。本研究では、海洋性珪藻 *P. tricornutum* における鉄応答性遺伝子である *iron starvation induced protein (Isi1)*, *ferrichrome binding protein (FBP1)* および *flavodoxin (Fld)* を中心に、それらの発現制御機構を解析することで、海洋性珪藻の鉄応答機構を解明することを目的とする。

はじめに、5'RACE, 3'RACE 法を用いて *Isi1*, *FBP1* および *Fld* の全長 cDNA をクローニングし、それぞれの 5'UTR、ORF、3'UTR 領域を同定した。また、それぞれの ORF 領域と *egfp* を連結させたコンストラクトを作成し、その内 *Fld* の局在が葉緑体ストロマであると同定した。さらに、これらの遺伝子の鉄飢餓応答性を qRT-PCR 法を用いて解析した結果、*Isi1*, *FBP1* および *Fld* すべての遺伝子で著しい鉄飢餓応答性を確認できた。

次に、それぞれの遺伝子のプロモーター領域内における鉄飢餓応答性シスエレメントの探索を行った。3つの遺伝子内には約 30 bp の鉄飢餓応答性領域が存在しており、その中にも相同性の高い motif A; A(A/C)G(G/C)C(G/-)C(A/G)TG と motif B; CACGTG(T/C)C が存在している。これら領域を制限酵素サイトもしくは一塩基置換したコンストラクトを作成し、GUS 活性解析を行うことで鉄飢餓応答性の変化を確認した。各遺伝子の motif を置換したコンストラクトの中で、P*Isi1* の motif B 置換体でのみ鉄飢餓応答性の消失が確認できた。しかし、その他の motif 置換体も鉄飢餓応答性が低下したことから、motif A と motif B が協調して働いている可能性や他の鉄飢餓応答領域が存在する可能性が示唆された。また、P*FBP1*(-286~-252)が恒常性プロモーターPCMVに鉄飢餓応答性を付加させたことから、これらの配列が鉄飢餓応答領域であることを確認した。また、一塩基置換体では、P*FBP1* の motif A PM2, 8, 10 と P*Isi1* の motif B PM2, 3 (1, 4, 7, 8)が鉄飢餓応答に重要であると示唆された。さらに、これらの鉄飢餓応答遺伝子は CO₂ 濃度にも応答し、pH には応答しないことから、鉄と CO₂ の 2 つの環境因子は密接にクロストークしていると考えられる。